

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12Q 1/02, C12N 15/09, A61K 31/165, A61P 35/00, A61K 45/00 // C12N 5/10		A1	(11) 国際公開番号 WO00/56917 (43) 国際公開日 2000年9月28日(28.09.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01778		(22) 国際出願日 2000年3月23日(23.03.00)	(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(30) 優先権データ 特願平11/77350 1999年3月23日(23.03.99)		JP	(75) 発明者／出願人 (米国について) 株式会社 中外分子医学研究所(CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP)
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 曾和義広(SOWA, Yoshihiro)[JP/JP] 〒600-8344 京都府京都市下京区東中筋道花屋町下る柳町 335-3 柳小路201 Kyoto, (JP)		(74) 代理人 織田哲郎(ORITA, Tetsuro)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)	(76) 添付公開書類 国際調査報告書
<p>(54) Title: METHOD FOR SCREENING ANTICANCER AGENT</p> <p>(54) 発明の名称 抗癌剤のスクリーニング方法</p> <p>(57) Abstract By analyzing a mechanism of the expression of cyclin-CDK inhibitory factor having a proliferation inhibitory effect (carcinostatic effect) induced by a histone deacetylase inhibitor (Trichostatin A), it is found out that binding of Sp3 to the Sp1 binding sequence contained in a promoter is important in the expression of the above factor. Thus, a novel antitumor agent can be developed by screening a drug capable of elevating the Sp3 activity.</p>			

増殖抑制効果(制癌作用)を有するサイクリン-CDK 阻害因子の発現が、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(トリコスタチンA)により誘導される機構を解析することにより、該因子の発現誘導には、プロモーターに存在する Sp1 結合配列に Sp3 が結合することが重要であることが判明した。従って、Sp3 の活性を上昇させる薬剤をスクリーニングすることにより、新たな抗腫瘍剤を開発することが可能となる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロvakia
AZ アゼルバイジャン	CA カボン	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴー	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ベトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明細書

抗腫瘍剤のスクリーニング方法

技術分野

本発明は、抗腫瘍剤をスクリーニングする方法に関する。より詳しくは、腫瘍抑制のメカニズムに関連する Sp3 タンパク質を標的とした抗腫瘍剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

癌とは、細胞周期、分化および形態を制御する正常な機構を破壊する一連の遺伝子変化の結果生じるものである。様々な癌細胞や形質転換細胞において、脱制御された細胞周期を停止させたり、分化を誘導したり、あるいは異常形態を正常形態に戻しうる能力に基づいて、数多くの天然化合物が単離されている。トリコスタチン A (Trichostatin A; 以下 TSA と略す)(Sugita K et al. (1992). Cancer Res., 52, 168-172)および trapoxin (Itazaki H et al. (1990). J. Antibiot., 43, 1524-1532)もまた、脱形質転換能を有する物質として単離された。しかもこれらの物質は、分化および細胞周期の停止も誘導する。しかしながらこれらの物質がいかにしてそのような抗腫瘍活性示すかは不明であった。

近年、ヒストン脱アセチル化酵素(以下 HDAC と略)が、これら薬剤の標的であると考えられている。実際、TSA および trapoxin は、抗腫瘍活性効果が認められたのと同様の濃度において、HDAC 活性を阻害する(Yoshida et al., 1990, J. Biol. Chem., 265:17174-17179; Kijima M et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 22429-22435)。急速に累積されてゆく知見は、ヒストンおよび非ヒストンタンパク質のアセチル化および脱アセチル化が、真核細胞の転写制御において重要な役割を果たしていることを示唆している(Wolffe AP and Pruss D. (1996). Ce

11, 84, 817-819、Wade PA et al. (1997). TIBS, 22, 128-132; Pazin MJ and Kadonaga JT. (1997). Cell, 89, 325-328; Struhl K. (1998). Genes Dev., 12, 599-606; Kuo MH and Allis CD. (1998). Bioessays, 20, 615-626)。多くの転写因子、転写活性補因子および基本転写開始複合体タンパク質がヒストンアセチル化酵素活性を有していることから、ヒストンのアセチル化が転写開始および促進に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。また、近年の幾つかのHDACのクローニングや転写抑制因子、転写抑制補因子がHDACと複合体を形成することから(Wolffe AP. (1997). Nature, 387, 16-17)、HDACが転写抑制においては重要な役割を果たしていることが徐々に明らかとなってきた。HDAC阻害剤が抗腫瘍活性を示すことから、HDACは、その遺伝子産物が細胞増殖の停止や分化を誘導する抗腫瘍遺伝子群の転写を抑制していると考えられるのかも知れない(DePinho RA. (1998). Nature, 391, 533-536)。

以前に本発明者らは、分化誘導剤としてよく知られており、mM濃度でHDAC阻害剤としても作用する酪酸ナトリウム(sodium butyrate)が、p53非依存形式でサイクリン-CDK阻害因子(負の細胞周期調節因子)であるp21/WAF1/Cip1の発現を誘導することを証明した(Nakano K et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 22199-22206)。さらに本発明者らは、sodium butyrateとTSAの両方がSp1結合配列を介して、p21/WAF1/Cip1遺伝子プロモーターを活性化させることも報告した(Sowa Y et al. (1997). Biochem. Biophys. Res. Comm., 241, 142-150)。興味深いことに、p21/WAF1/Cip1プロモーターのSp1結合部位はTGF- β 、phorbol ester、okadaic acid、progesteroneあるいはgeranylgeranyl-transferase I阻害剤GGTI-298によるp21/WAF1/Cip1誘導の際にも関与することが近年報告されている(Datto MB et al. (1995). J. Biol. Chem., 270, 28623-28628; Biggs JR et al. (1996) J. Biol. Chem., 271, 901-906; Adnane J et al. (1998) Mol. Cell. Biol., 18, 6962-6970; Owen GI et al. (1998). J. Biol. Chem., 273, 10696-10701)。これらのうち、TGF- β やGGTI-298はSp1の転写活性を増強

することにより、また、progesteroneについても Sp1 および CBP/p300 を介して p21/WAF1/Cip1 の転写を誘導することが報告されている(Li JM et al. (1998). Nucleic Acids Res., 26, 2449-2456; Owen GI et al. (1998). J. Biol. Chem., 273, 10696-10701)。

これらの報告は、Sp1 を介したヒストンアセチル化酵素の活性化による転写誘導を示唆するものと考えられる。ヒストンアセチル化は数多くの遺伝子の転写活性化に関与すると考えられてきている。逆にヒストン脱アセチル化は転写抑制に関与すると考えられているが、詳細な機構は明らかでない。近年、転写抑制因子である N-CoR および SMRT が核内転写因子に結合することにより DNA 配列特異的に転写を抑制することが報告されている(Horlein AJ et al. (1995). Nature, 377, 397-404; Kurokawa R et al. (1995). Nature, 377, 451-454.; Chen JD and Evans RM. (1995). Nature, 377, 454-457)。また、これらの因子は同時に HDAC と結合して高次複合体を形成することから、ヒストン脱アセチル化を介してクロマチンの構造を強固にすることにより転写が抑制されることが示唆されている(Pazin MJ and Kadonaga JT. (1997). Cell, 89, 325-328; Heinzel T et al. (1997). Nature, 387, 43-48; Allard L et al. (1997) Nature, 387, 49-55)。実際に、promyelocytic leukemiaあるいは promyelocytic leukemia zinc-finger タンパク質とレチノイン酸受容体の融合タンパク質を用いた検討からは、HDAC の結合が転写抑制に必要であることが示されている(Lin RJ et al. (1998). Nature, 391, 811-814; Grignani F et al. (1998). Nature, 391, 815-818; He LZ et al. (1998). Nature Genet., 18, 126-135)。同様の HDAC を介した DNA 配列特異的な転写抑制機構は Myc/Mad/Max (Hassig C et al. (1997). Cell, 89, 341-347; Laherty CD et al. (1997). Cell, 89, 349-356)、E2F/Rb (Brehm A et al. (1998). Nature, 391, 597-601; Magnaghi-Jaulin L et al. (1998). Nature, 391, 601-605; Luo RX et al. (1998). Cell, 92, 463-473)あるいは DNA メチル化(Nan X et al. (1998). Nature, 393, 386-389; Jones PL et al. (1998).

Nature Genet., 19, 187-191)の場合にも明らかになっている。しかしながら、Sp1 結合配列に結合能をもつ特異的転写因子が、HDAC 阻害剤による転写活性化シグナルを介在するか否かは不明であった。

発明の開示

本発明は、効率的な抗腫瘍剤のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、抗腫瘍効果を示し、また HDAC 阻害剤として知られている TSA が、p21/WAF1/Cip1 プロモーターを Sp1 結合配列を介して活性化することを報告している (Nakano K et al. (1997). J. Biol.chem., 272, 22199-22206、Sowa et al. (1997). Biochem. Biophys. Res. Comm., 241, 142-150)。本発明者らは、この TSA 刺激に応答した p21/WAF1/Cip1 プロモーターの活性化におけるシグナル伝達に関与する新たな分子を同定することにより、該分子を標的とした抗腫瘍剤のスクリーニングが可能となると考えた。

そこで、本発明者らは、まず、TSA による p21/WAF1/Cip1 プロモーターの活性化において、該プロモータの Sp1 結合配列に結合している因子を MG63 細胞核抽出物のゲルシフトアッセイにより検索し、p21/WAF1/Cip1 プロモーターの Sp1 結合配列には Sp1 および Sp3 (Lania L et al. (1997). Int. J. Biochem. Cell Biol., 29, 1313-1323) が主に結合していることを明らかにした。

また、本発明者らは、p21/WAF1/Cip1 プロモーターとは別に、GAL4 結合配列依存性に活性化されるルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いたアッセイ系により Sp1 および Sp3 の機能の検討を行い、GAL4 と Sp3 の融合タンパク質である GAL4-Sp3 の存在下では TSA によるレポーター遺伝子の転写誘導が起こるが、GAL4 と Sp1 の融合タンパク質である GAL4-Sp1 にはこの作用がないことを明らかにした。さらに、Sp3 の種々の欠失変異体を作成することにより、転写活性化ドメインに 2箇所存在するグルタミンリッチ (glutamine-rich) ドメインのうち少

なくとも 1 つを有すれば、TSA 刺激に応答した転写活性化が生じうることを示した。さらに、転写活性化ドメインを欠失したドミナントネガティブ Sp3 の強制発現により、TSA による p21/WAF1/Cip1 プロモーターおよび Sp1 結合配列活性化プロモーターの活性化が抑制されることを明らかにした。

これら結果は、TSA による p21/WAF1/Cip1 の転写活性化に Sp3 が関与していることを証明するものであり、さらに、Sp3 を標的として抗腫瘍剤のスクリーニングが可能であることを示唆するものである。本発明者らにより開発された、GAL4 結合配列依存性に活性化されるルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いたアッセイ系は、効率的な抗腫瘍剤のスクリーニングに特に好適である。

本発明は、腫瘍抑制のメカニズムに関する Sp3 タンパク質を標的とした抗腫瘍剤のスクリーニング方法、特に GAL4 結合配列依存性に活性化されるルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いて効率的に抗腫瘍剤をスクリーニングする方法に関する。

より具体的には、本発明は、

- (1) 抗腫瘍剤をスクリーニングする方法であって、
 - (a) (i) Sp3 タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質の DNA 結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードする DNA を発現可能に含む第一のベクター、並びに (ii) 該異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む第二のベクター、を保持する細胞を提供する工程、
 - (b) 該細胞に対し、被検試料を接触させ、該レポーター活性を測定する工程、
 - (c) 被検試料を該細胞に接触させない場合(対照)と比較して、該レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、
- (2) 異種タンパク質が GAL4 タンパク質、LexA タンパク質、またはテトラサイクリンリプレッサータンパク質である、(1) に記載の方法、

(3) レポーター遺伝子がルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ヒト成長ホルモン、または分泌型アルカリホスファターゼをコードする、(1) または (2) に記載の方法、

(4) Sp3 を介する転写活性を促進する化合物を有効成分とする抗腫瘍剤、

(5) (1) から (3) のいずれかに記載のスクリーニングにより単離しうる、

(4) に記載の抗腫瘍剤、に関する。

実施例に示したように、Sp3 の転写活性化ドメインは、p21/WAF1/Cip プロモーターからの転写を上昇させる作用を有する。p21/WAF1/Cip は細胞増殖抑制効果を有しており、制癌作用を有することが知られている TSA により発現が上昇する遺伝子である。また、p21/WAF1/Cip の発現は、抗腫瘍効果と深い関連がある複数の HDAC 阻害剤により、Sp1 結合配列を介して誘導されることが知られている。本発明により、この Sp1 結合配列を介した転写誘導には、Sp3 が関与していることが示されたことから、Sp3 の活性を促進させることにより細胞の異常増殖を抑制し、腫瘍に対する治療や予防を行うことが可能となると考えられる。

本発明の抗腫瘍剤のスクリーニング方法は、このように Sp3 が TSA 刺激による抗腫瘍効果の発現のシグナル伝達に関与するという、本発明者らにより見出された知見に基づくものである。さらに、本発明者らにより開発されたレポーター遺伝子を利用した Sp3 の転写活性の検出系が、TSA のような抗腫瘍効果を示す化合物のスクリーニングに利用しうるという知見にもに基づくものである。

本発明のスクリーニング方法の原理は、以下のとくである。まず、Sp3 タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質の DNA 結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードする DNA を発現可能に含む第一のベクター、並びに該異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む第二のベクターを構築し、これを細胞に導入する。この細胞では、第一のベクターに由来して、Sp3 タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タン

パク質の DNA 結合能を有する領域を含む融合タンパク質が発現し、その中の異種タンパク質由来の DNA 結合領域を介して第二のベクター上の発現制御領域に結合する。この細胞に、TSA のような抗腫瘍のシグナルに正に作用する化合物が接触した場合、該融合タンパク質の中の Sp3 タンパク質由来の転写活性化領域を介して第二ベクターの発現制御領域の下流に存在するレポーター遺伝子の転写を活性化するか、あるいは転写抑制を解除することにより、該レポーター遺伝子の発現が誘導される。従って、このレポーター遺伝子を用いたアッセイ系を利用すれば、被検試料を細胞に接触させた後の細胞におけるレポーター活性を検出することにより、効率的に Sp3 を介した抗腫瘍剤のスクリーニングを行うことができる所以ある。

即ち、本発明のスクリーニング方法は、(a) (i) Sp3 タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質の DNA 結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードする DNA を発現可能に含む第一のベクター、並びに (ii) 該異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む第二のベクター、を保持する細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対し、被検試料を接触させ、該レポーター活性を測定する工程、(c) 被検試料を該細胞に接触させない場合(対照)と比較して、該レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含むものである。

本発明のスクリーニングに用いられる第一のベクターは、Sp3 タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質の DNA 結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードする DNA を発現可能に含む。「発現可能に含む」とは、融合タンパク質をコードする DNA がベクターにおいてその発現を保証する発現制御領域(例えば、プロモーターやエンハンサー)に結合していることを指す。例えば、融合タンパク質をコードする DNA は、ベクター内で CMV プロモーターなどの適当なプロモーターの下流に挿入されており、該ベクターは、動物細胞や酵母

細胞などの適当な宿主細胞内において、該融合タンパク質を発現することができる。

第一のベクターにより発現される融合タンパク質に含まれる Sp3 タンパク質の転写活性化能を有する領域としては、TSA 刺激に応答して転写活性化しうる領域を含む限り特に制限はない。好ましくは、転写活性化ドメインの少なくとも一部を含み、DNA 結合ドメインの少なくとも一部を欠失している。Sp3 由来の DNA 結合領域は存在していても、本発明のスクリーニングは可能であるが、該領域が存在するとこれを含む融合タンパク質が内在性の種々の Sp1 結合配列に結合するため好ましくない。ヒト Sp3 タンパク質であれば、好ましくは 2 つの glutamine-rich 領域（アミノ酸 10～123 およびアミノ酸 223～358）のいずれか一方または双方を含み、Zinc finger 領域（アミノ酸 495 から 517、525 から 547、および 555 から 575）の少なくとも一部を含まない（Chris, K. et al., 1992, J. Biol. Chem., 12: 4251-4261）。Sp3 タンパク質が由来する生物種に制限はない。例えば、ヒトや哺乳動物由来の Sp3 タンパク質、その他の生物種の Sp3 タンパク質を用いることができる。

具体的には、図 3 に示した、ヒト Sp3 タンパク質のアミノ酸配列の 1 から 398 位の領域、81 から 398 位の領域、161 から 398 位の領域、1 から 320 位の領域、1 から 240 位の領域、1 から 160 位の領域を本発明において好適に利用することができるが、これらに制限されない。

また、第一のベクターにより発現される融合タンパク質に含まれる異種タンパク質としては、特定の DNA 配列に特異的に結合しうるタンパク質であれば特に制限はない。例えば、GAL4 タンパク質、LexA タンパク質（Gyuris, J. et al., 1993, Cell, 75: 791-803）、テトラサイクリン リプレッサー タンパク質（Tet R）（Manfred, G. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551）などが挙げられるが、これらに制限されない。また、特定の DNA 配列に特異的に結合しうる限り、これらタンパク質の部分ペプチドであってもよい。異種タンパ

ク質のDNA結合能を有する領域としては、例えば、GAL4タンパク質のDNA結合ドメイン(例えばアミノ酸1~94、または1~147)、LexAタンパク質のDNA結合ドメイン(例えばアミノ酸1~202)(Erica, A. et al., 1992, Mol. Cell. Biol., 12: 3006-3014)、テトラサイクリンリプレッサータンパク質(Tet R)のDNA結合ドメイン(Manfred, G. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551)などを含むペプチドが挙げられるが、これらに制限されない。

本発明の第二のベクターは、異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む。

本発明の第二のベクターの構築に用いられる異種タンパク質の結合配列としては、第一の発現ベクターから発現誘導された融合タンパク質が特異的に結合しうる配列であれば特に制限はない。例えば、融合タンパク質がGAL4 DNA結合領域を含む場合、結合配列としては、例えば「5'-cgga_sgacwgtcstccg-3'； s=c または g, w=a または t」(Marmorstein, R. et al., 1992, Nature 356:408-414)が挙げられる。また、融合タンパク質がLexA DNA結合領域を含む場合、結合配列としては、例えば「5'-ctgt_nnnnnnnnnnacag-3'； n=a, t, g, または c」(Erica, A. et al., 1992, Mol. Cell. Biol., 12: 3006-3014)が挙げられる。また、融合タンパク質がテトラサイクリンリプレッサータンパク質(Tet R)のDNA結合ドメインを含む場合、結合配列としては、例えば「5'-tccctatcagtgata_{gaga}-3'」(Manfred, G. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551)が挙げられる。

該結合配列は、ベクターが導入される細胞の内因性タンパク質により認識されないものを用いることが好ましい。内因性タンパク質により認識される配列を用いた場合には、内因性タンパク質の作用に応答したレポーター活性が検出されるおそれがあるため好ましくない。

該結合配列に第一のベクター由来の融合タンパク質が結合した際の、下流のレポーター遺伝子の発現を保証するために、第二のベクターにおける発現制御配列には、該結合配列以外に、プロモーター配列（例えば、TATA配列、Kozak配列などを含みうる）を含むことができる。

第一のベクターからの融合タンパク質がそのDNA結合能を有する領域として、GAL4タンパク質のDNA結合ドメインを用いる場合、第二のベクターに用いられる発現制御配列としては、例えば、5×GAL4結合配列、E1B最小プロモーターおよびTATA配列を含むDNA配列を用いることができる。

本発明の第二のベクターにおいては、該発現制御配列の下流にレポーター遺伝子を機能的に結合する。「機能的に結合」とは、レポーター遺伝子が、第一のベクター由来の融合タンパク質の発現制御配列への結合に応答して発現するように、該発現制御配列に結合していることを指す。

本発明において用いられるレポーター遺伝子としては、その発現産物が検出可能であれば特に制限はないが、ノーザン解析やウェスタン解析などの煩雑な操作を行わずに該発現産物を検出できるものが好ましい。好ましいレポーター遺伝子としては、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)遺伝子、ヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)遺伝子などが挙げられる。

本発明のスクリーニングを利用する細胞としては特に制限はなく、例えばヒトまたは哺乳動物の細胞、例えばp53が遺伝的に欠失したMG63細胞（ヒト骨肉腫由来の細胞株）を用いることができる。また、酵母細胞や大腸菌などの微生物細胞を用いることもできる。ベクターの作成のための遺伝子操作や細胞へのベクターの導入などは、当業者に公知の方法を利用することができる。

本発明のスクリーニングにおいては、上記2つのベクターが導入された細胞に対し、被検試料を接触させ、レポーター活性を測定する。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、天然物抽出液などが挙げられるが、これらに制限されない。細胞への被検試料の接触は、被検試料の種類に応じて、被検試料の細胞培養培地への添加や被検試料の細胞内への導入（遺伝子導入も含む）などの方法で行うことができる。

レポーター活性は、レポーター遺伝子の種類に応じて当業者に公知の方法により検出することができる。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合には、細胞抽出液にルシフェラーゼの基質を加え、酵素反応により発生する発光量を化学発光検出器により検出することができる。また、レポーター遺伝子として CAT 遺伝子を用いた場合には、細胞抽出液中の CAT 量を抗 CAT 抗体を用いた ELISA 法により検出することができる。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を用いた場合には、細胞抽出液に β -ガラクトシダーゼの基質を加え、酵素反応により発生する発光量を化学発光検出器により検出することができる。ヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子を用いた場合には、細胞培養液中の hGH 量を抗 hGH 抗体を用いた ELISA 法により検出することができる。また、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)遺伝子を用いた場合には、細胞培養液にアルカリホスファターゼの基質を加え、酵素反応により発生する発光量を化学発光検出器により検出することができる。

レポーター活性の測定の結果、被検試料を接触させない場合（対照）に比べレポーター活性の有意な上昇が認められれば、用いた被検化合物は腫瘍の増殖を抑制する化合物の候補となる。

本発明において、抗腫瘍効果に関連する TSA からのシグナル伝達において、Sp3 を介する転写活性が促進することが示された。この事実は、Sp3 を介する転写活性を促進することができる化合物が、抗腫瘍効果を有しうることを示すもので

ある。従って、本発明は、また、Sp3 を介する転写活性を促進する化合物を有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

このような Sp3 活性を促進する化合物としては、種々の作用点を有するものが考えられる。例えば、Sp3 に直接作用してその機能を促進するもの、Sp3 に結合する分子に作用して間接的に Sp3 の機能を促進するもの、Sp3 の DNA への結合から転写に至るまでの反応に関与するタンパク質群に作用するもの、Sp3 と HDAC との相互作用を阻害するもの、HDAC の活性を阻害するもの、Sp1 の機能を阻害するものが含まれる。このような化合物は、上記の本発明のスクリーニングにより単離することが可能である。

本発明の Sp3 を介する転写活性を促進する化合物は、広範囲の腫瘍に適用可能と考えられる。特に、Sp3 を介した p21/WAF1/Cip1 の発現誘導は p53 非依存的であることから、p53 に変異または欠失を持つ腫瘍に対しても適用できることが期待される。

本発明の Sp3 を介する転写活性を促進する化合物を、医薬品として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることが可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。

患者への投与は、化合物の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われうる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、TSA依存性のp21/WAF1/Cip1プロモーター活性化に必要なSp1結合配列へのSp1およびSp3の結合を示す電気泳動写真である。TSA刺激(レーン5-9)および未刺激(レーン1-4)のMG63細胞核抽出液にてEMSAを行った。TSA依存性のプロモーター活性化に必要なSp1結合配列(転写開始点より-87~-72)をDNAプローブとした。各バンドに対するスーパーシフトアッセイを抗Sp1抗体(レーン2, 4, 6または8)あるいは抗Sp3抗体(レーン3, 4, 7または8)を用いて行った。Sp1およびSp3のバンドの位置を図左に示した。

図2は、Sp3によるTSA依存性の転写誘導を示す。2.5 μ gのGAL4-Sp1あるいはGAL4-Sp3プラスミドと0.5 μ gのpG5-lucレポータープラスミドをMG63細胞に同時にトランスフェクションした。24時間後にTSA(500ng/ml)を加え、さらに24時間後に細胞を溶解してルシフェラーゼ活性を測定した。TSAによる転写誘導はTSA未刺激の対照値との比で示した。実験は3連で行い、示したデータは5回の実験の代表的な結果である。

図3は、Sp3のglutamine-richドメインを介するTSA依存性の転写誘導を示す。各種GAL4-Sp3の欠失変異タンパク質の配列を図に示した。また、各タンパク質をMG63細胞に発現させた時のTSAによる転写誘導の割合を図右にそれぞれ示した。トランスフェクションおよびTSA刺激は図2と同様に行った。実験は3連で行い、示したデータは3回の実験の代表的な結果である。

図4は、ドミナントネガティブSp3によるTSA依存性のp21/WAF1/Cip1プロモーターあるいはSp1プロモーター転写誘導の抑制を示す。0、1.25、2.5または5.0 μ gのpCMV-DNSp3を、対照のpCMV3.1を加えてプラスミド量を合計5.0 μ gに調整し、0.5 μ gのレポータープラスミドと同時にMG63細胞にトランスフェクションした。レポータープラスミドにはpWWP(a)、pWPdel-BstXI(b)、Sp1-luc(c)あるいはmtSp1-luc(d)を用いた。トランスフェクションおよびTSA刺激は図2と同様に行った。実験は3連で行い、3回の実験の代表的な結果を示した。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] p21/WAF1/Cip1 プロモーターの Sp1 結合配列のゲルシフトアッセイ

TSA は p21/WAF1/Cip1 遺伝子のプロモーター領域に存在する Sp1 結合配列を介して、p53 非依存性に p21/WAF1/Cip1 遺伝子の転写を誘導する。そこで、この誘導機序を解明する目的で、TSA による転写誘導に必須である転写開始点より-87 ～-72 bp を p21/WAF1/Cip1 プローブとして以下のようにしてゲルシフトアッセイ (Electrophoretic mobility shift assay; EMSA) による結合タンパク質の解析を行った。

(1-1) 細胞培養および核抽出液の調製

まず MG63 細胞を、10%牛胎仔血清(GIBCO BRL)を含む DMEM 培地(GIBCO BRL)を用いて、5% CO₂ 大気湿条件下、37°Cにて培養した。この細胞の核抽出液を、Dignam らの方法(Dignam JD et al. (1983). Nucleic Acids Res., 11, 1475-1489)に従い、TSA 刺激および未刺激細胞より調製した。まず、ディッシュ(100 mm)に培養した細胞を 500 ng/ml の TSA (和光純薬)で 24 時間インキュベートした後、0.5 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoreide · HCl (p-ABSF)(和光純薬)を含む冷 PBS で 2 回洗浄し、ディッシュより掻き取って、10 mM KCl、1.5 mM Mg Cl₂、0.5 mM DTT、5 mM NaF、5 mM NaVO₄、0.5 mM p-ABSF を含む 10 mM Hepes/KOH 緩衝液(pH7.9)に懸濁した。氷上で 10 分間静置した後、ダウス型ホモジナイザーを用いて細胞を破碎した。3,000 rpm、10 分間、4°Cで遠心の後、核を 400 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、25% glycerol、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、5 mM NaF、5 mM NaVO₄、0.5 mM p-ABSF を含む 20 mM Hepes/KOH 緩衝液(pH7.9)に再懸濁し、4°Cにて 60 分間攪拌、核成分を溶出した。その溶出液を 35,000 rpm、30 分間、

4°Cで遠心し、その上清を核抽出液として回収した。得られた核抽出液は、400 mM KCl、20% glycerol、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、5 mM NaF、5 mM NaVO₄、0.5 mM p-ABSF を含む 20 mM Hepes/KOH 緩衝液(pH7.9)に対して透析を行い、-80°Cに保存した。

(1-2) ゲルシフトアッセイ (EMSA)

次に、p21/WAF1/Cip1 遺伝子の転写開始点より-87～-72 bp に存在する TSA 依存性のプロモーター配列(5'-CGGGTCCCGCCTCCTT-3' /配列番号：1)をもとにオリゴヌクレオチド(5'-AGCTCGGGTCCCGCCTCCTT-3' /配列番号：2、および 5'-TCGAAA GGAGGCAGGACCCG-3' /配列番号：3)を合成し、アニール後、[α -³³P] dCTP、Klenow Fragment (TAKARA) を用いて DNA をラベルし、これを DNA プローブとした。上記の核抽出液(8 μ g)を 20 μ l の反応液(8 mM Tris/HCl (pH7.9)、24 mM Hepes/KCl (pH7.9)、120 mM KCl、24% glycerol、2 mM EDTA、2 mM DTT、1 mg poly (dI-dC)(Pharmacia))中で 5 分間インキュベートした後、³³P ラベルした DNA プローブ(比活性 50,000 cpm/ μ l)を加えてさらに 20 分間結合反応を行った。なお、後述の抗体によるスーパーシフトの実験では、さらに 2 μ g の抗 Sp1 あるいは 1 μ g 抗 Sp3 抗体(Santa Cruz, sc-59X and sc-644X)を加えて 20 分間インキュベートした。反応液を 6%アクリルアミドゲルにて泳動し、BAS 2000 (Fujix)を用いて p21/WAF1/Cip1 プローブに結合するタンパク質を検出した。

(1-3) 結果

TSA 刺激および未刺激の MG63 細胞より調製した核抽出液を p21/WAF1/Cip1 プローブと反応させ、上記のゲルシフトアッセイを行ったところ、2 本の特異的なバンドが検出された(図 1、1 および 5)。ついで、抗 Sp1 あるいは抗 Sp3 抗体を用いて、上述の方法によりスーパーシフトによる各バンドの反応性を見たところ、抗 Sp1 抗体により上側のバンドの一部、抗 Sp3 抗体で上側のバンドの一部と下側の 2 本のバンドがシフトし、抗 Sp1 抗体と抗 Sp3 抗体を両方加えることで、すべてのバンドのシフトが観察された(図 1)。Sp3 の 2 本のバンドはそれぞれ高分子

(97 kDa) と低分子 (60 kDa と 65 kDa) の Sp3 タンパク質に由来すると考えられる(Gustav H. et al. 1994, EMBO J., 13, 3843-3851; Addanki P. B. et al. 1997, Nucleic Acids Res., 25, 2012-2019)。したがって、MG63 細胞の核抽出液に存在する Sp1 および Sp3 が実際に p21/WAF1/Cip1 の Sp1 結合部位と結合することが示され、Sp1 および Sp3 が TSA 依存性の転写誘導に関与することが示唆された。これらの結果は以前の本発明者らの報告(Nakano K et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 22199-22206)および他のグループの報告(Datto MB et al. (1995). J. Biol. Chem., 270, 28623-28628; Adnane J et al. (1998) Mol. Cell. Biol., 18, 6962-6970)と一致した。しかしながら、TSA による刺激の有無により Sp1 および Sp3 の DNA 結合量には差が認められなかった(図 1)。このことから、TSA 依存性の転写誘導は Sp1 あるいは Sp3 の発現量あるいは DNA 結合能の変化以外の機序によるものと推察された。これは同じく HDAC 阻害剤である sodium butyrate を用いた本発明者らの報告(Nakano K et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 22199-22206)および TGF- β 依存性の転写誘導をみた Datto らの報告(Datto MB et al. (1995). J. Biol. Chem., 270, 28623-28628)と一致したが、geranyl geranyl-transferase I 阻害剤を用いた Adnane らの報告(Adnane J et al. (1998) Mol. Cell. Biol., 18, 6962-6970)とは異なる。

[実施例 2] GAL4 結合配列を用いたレポーター アッセイ

TSA は、p21/WAF1/Cip1 プロモーターの Sp1 結合配列を介して転写誘導を起こすのと同様に、SV40 プロモーターに挿入したコンセンサスな 3xSp1 結合配列を介しても転写誘導を起こすことができる(Sowa Y et al. (1997). Biochem. Biophys. Res. Comm., 241, 142-150)。そこで、この Sp1 結合配列に結合が認められた Sp1 あるいは Sp3 が実際に TSA 刺激による転写誘導に関与するかどうかを、GAL4 結合配列を用いたレポーター アッセイ系で検討した。すなわち、Sp1 や Sp3 の作用を強制発現で見ようとする際に、Sp1 結合配列をレポーター遺伝子のプロモーターとして用いても内因性の Sp1 あるいは Sp3 の作用を検出しまうため、バク

テリアの GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメインと Sp1 あるいは Sp3 との融合タンパク質を強制発現させ、GAL4 結合配列依存性の転写活性が TSA で誘導されるかどうか、また、その誘導が Sp1 と Sp3 のいずれで制御されるのかを解析した。

(2-1) 発現プラスミドおよびレポータープラスミド

GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメインの C 末端側に Sp1 (アミノ酸 83~778)、全長 Sp3 (アミノ酸 1~653)、転写活性化ドメイン欠失 Sp1 (アミノ酸 592~778) (DNSp1) および転写活性化ドメイン欠失 Sp3 (アミノ酸 399~653) (DNSp3) をそれぞれ融合したタンパク質を発現させる目的で、GAL4 結合ドメインを含む pM ベクター (Clontech) に各遺伝子を挿入し、pM-Sp1、pM-Sp3、pM-DNSp1 および pM-DNSp3 を作成した。各 Sp1 および Sp3 遺伝子は PCR 法により増幅した。具体的には、pM-Sp1 の作製には、Sp1-S プライマー (5'-acaggtgagcttga-3' / 配列番号 : 4) および Sp1-AS プライマー (5'-tcagaagccattgcc-3' / 配列番号 : 5) を用いて、pPacSp1 を鋳型にして増幅を行った (Kadonaga, J.T. et al., 1987, Cell, 51: 1079-1090)。pM-DNSp1 の作製には、DNSp1-S プライマー (5'-ccaaaaaaagaa gagaaaggtaacccggcgg-3' / 配列番号 : 6) および DNSp1-AS プライマー (5'-gaagc atgcacctgc-3' / 配列番号 : 7) を用いて、pM-Sp1 を鋳型にして増幅を行った (Kadonaga, J.T. et al., 1987, Cell, 51: 1079-1090)。pM-Sp3 の作製には、Sp3-18F プライマー (5'-cgggatccattccaagtgtctgtct-3' / 配列番号 : 8) および Sp3-2R プライマー (5'-ataggatccttactccattgtctcatatcc-3' / 配列番号 : 9) を用いて、Marathon-Ready cDNA (Human Fetal Liver) (Clontech, Cat. #7403-1) を鋳型にして増幅を行った (Chris, K. et al., 1992, J. Biol. Chem., 12: 4251-4261)。pM-DNSp3 の作製には、Sp3-11F プライマー (5'-cgggatccaactctataga ttctgtct-3' / 配列番号 : 10) および Sp3-2R プライマー (配列番号 : 9) を用いて、pM-Sp3 を鋳型にして増幅を行った (Chris, K. et al., 1992, J. Biol. Chem., 12: 4251-4261)。PCR の反応は、全て「94°C 1 分、55°C 30 秒、72°C 30 秒」を 30 サイクルの条件で行った。PCR の増幅産物は pM ベクターに挿入し、DNA シー

ケンサー ABI PRISM 355 (Applied Bio System)により塩基配列の確認を行った。トランスフェクション試験の対照としては GAL4 DNA 結合ドメインのみを発現する pM を用いた。GAL4 依存性の転写活性の指標となるレポータープラスミド (pG5-luc) としては、5xGAL4 結合配列、E1B 最少プロモーターおよび TATA 配列をルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入した pGL3-Basic Vector (Promega) を用いた。

(2-2) トランスフェクションアッセイ

Sp1あるいはSp3の各種 GAL4 融合タンパク質をコードする上記発現ベクターは、コンセンサスな 5xGAL4 結合配列の下流にルシフェラーゼレポーター遺伝子を持つ上記ベクターとともに、SuperFect を用いた QIAGEN 社の方法に従って MG63 細胞にトランスフェクトした。すなわち、12 穴プレートに 0.8×10^5 個/well の細胞を捲き、24 時間後に、あらかじめ $0.5 \mu\text{g}$ のレポータープラスミド、 $2.5 \mu\text{g}$ の発現ベクターおよび SuperFect を混合した反応液を MG63 細胞に添加して 2 時間反応させた。引き続き通常の培養条件下で 24 時間培養し、500 ng/ml の TSA 存在下あるいは非存在下(対照)でさらに 24 時間培養した後、細胞を溶解しルシフェラーゼ基質(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を LB-96P (Berthold) で測定した。測定値は同一タンパク量当たりの活性に換算して表し、TSA による転写誘導は TSA 非存在下の対照値との比 (TSA による活性化倍率) として計算した。

(2-3) 結果

その結果、TSA 未刺激の状態でも GAL4-Sp1 および GAL4-Sp3 とも転写活性を示したが、これは Sp1 および Sp3 自体に存在する転写活性化ドメインを介したものと推察された。ところが、TSA で刺激した際には、GAL4-Sp3 を発現させた細胞では著明なルシフェラーゼ遺伝子の転写誘導作用が見られたのに対し、GAL4-Sp1 を発現させた細胞では対照の GAL4 と同じ割合の増強しか認められなかった(図 2)。さらに、上記した N 末端側の転写活性化ドメインを欠失した Sp1 あるいは Sp3 と GAL4 の DNA 結合ドメインとの融合タンパク質について同様の検討を行ったところ、GAL4-DNSp3 はもはや TSA 依存性の転写誘導作用を示すことができな

かった(図2)。このことから、TSA刺激によるp21/WAF1/Cip1遺伝子の転写誘導はプロモーターのSp1結合配列に結合したSp3の転写活性化ドメインを介して起こることが示唆された。

[実施例3] Sp3のTSA応答領域の同定

つぎに、Sp3のTSA応答領域を同定する目的で、GAL4のDNA結合ドメインと融合した種々のSp3欠失変異体を用いたレポーターアッセイを行った。まず、pM-Sp3 (1-398)、pM-Sp3 (81-398)、pM-Sp3 (161-398)、pM-Sp3 (241-398)、pM-Sp3 (1-80)、pM-Sp3 (1-160)、pM-Sp3 (1-240)およびpM-Sp3 (1-320)を作成した。それぞれ、記載のアミノ酸番号に相当する領域を持つ。各Sp1およびSp3遺伝子はPCR法により増幅した後、pMベクターに挿入し、DNAシーケンサーABI PRISM 355 (Applied Bio System)により塩基配列の確認を行った。なお、PCR法による増幅に用いたプライマー配列を表1に示す。PCRは錠型にpM-Sp3を用い、「98°C15秒、65°C2秒、74°C30秒」を25サイクルの条件で行った。

表 1

プラスミド プライマー

pM-Sp3(1-398)

Sp3-18F

(5'-cgggatccattccaagtgctgct-3' /配列番号 : 8)

Sp3(1194-1177)AS + BamHI

(5'-gcggatcccactgttaactgttttag-3' /配列番号 : 11)

pM-Sp3 (81-398)

Sp3(241-260) S + BamHI

(5'-cgggatccggcttaatcaaaccctact-3' /配列番号 : 12)

Sp3(1194-1177)AS + BamHI (配列番号 : 11)

pM-Sp3 (161-398)

Sp3(481-500) S + BamHI

(5'-cgggatccggcattaatgccgacggaca-3' /配列番号 : 13)

Sp3(1194-1177)AS + BamHI (配列番号 : 11)

pM-Sp3 (241-398)

Sp3(721-740) S + BamHI;

(5'-cgggatcccaggaaattatatccagtc-3' /配列番号 : 14)

Sp3(1194-1177)AS + BamHI (配列番号 : 11)

pM-Sp3 (1-80)

Sp3-18F (配列番号 : 8)

Sp3(240-221)AS + BamHI

(5'-cgggatccaggaatgtatctgaatttgac-3' /配列番号 : 15)

pM-Sp3 (1-160)

Sp3-18F (配列番号 : 8)

Sp3(480-461)AS + BamHI

(5'-cgggatcctgcagtcatgtctgagaac-3' /配列番号 : 16)

pM-Sp3 (1-240)

Sp3-18F (配列番号 : 8)

Sp3(720-701)AS + BamHI

(5'-cgggatccaagatctgaagaatgaacct-3' /配列番号 : 17)

pM-Sp3 (1-320)

Sp3-18F (配列番号 : 8)

Sp3(960-941)AS + BamHI

(5'-cgggatccaaagggttccaggattcagct-3' /配列番号 : 18)

トランスフェクション試験の対照としては GAL4 DNA 結合ドメインのみを発現する pM を用いた。GAL4 依存性の転写活性の指標となるレポータープラスミド (pG5-luc) としては、上記の pGL3-Basic Vector (Promega) を用いた。

これらの遺伝子を用いて、上記と同様の方法によりトランスフェクションを行い、TSA 刺激による転写誘導がこれらの変異体によって起こるかどうかを測定した。その結果、Sp3 の DNA 結合ドメインを欠失した GAL4-Sp3 (1-398) のみでも TSA 依存性の転写誘導が起こり、その誘導は GAL4-Sp3 よりむしろ強いものであった(図 3)。これは先に述べた N 末端側の転写活性化ドメインの欠失で TSA 刺激による転写誘導が消失する結果(実施例 2) と相關した。また、Sp3 に存在する 2 つの glutamine-rich ドメインのうちの C 末端側のドメインと DNA 結合ドメインの間に存在する抑制性ドメインが Sp3 の転写活性を抑制するという報告とも相關を示唆した (Dennig J et al. (1996). EMBO J., 15, 5659-5667; Majello B et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 4021-4026)。

また、図 3 に示すように、Sp3 (1-398) の N 末端側もしくは C 末端側から欠失を加えた場合、GAL4-Sp3 (241-398) および GAL4-Sp3 (1-80) において TSA 刺激による誘導が消失した。これらの結果から、Sp3 (81-160) が TSA 刺激による転写誘導に重要と考えられたが、GAL4-Sp3(81-160) のみでは活性はほとんど認められなかった。GAL4-Sp3 (241-398) および GAL4-Sp3 (1-80) とも完全な glutamine-rich ドメインを欠くことから、TSA による転写誘導には Sp3 の転写活性化ドメインの 2 つの glutamine-rich ドメインのうち少なくともいずれか一方が存在することが必須であることが示された。また、Sp3 の 80-160 の部分には TSA 刺激による転写誘導に重要な領域の一部が含まれていることが考えられる。

[実施例 4] ドミナントネガティブ Sp3

さらに、Sp3 が p21/WAF1/Cip1 の Sp1 結合配列を介する TSA の転写誘導に実際に関与するかいかないかを検討する目的で、転写活性化ドメインを欠失し、DNA 結合ドメインのみをもつ Sp3 変異体(DNSp3) (アミノ酸 399~653) を pCMV3.1-His-C

(Invitrogen)に組み込んだ pCMV-DNSp3 を作成した。対照としては pCMV3.1 を用いた。レポータープラスミドには以前に報告した p21/WAF1/Cip1 プロモーター、TSA に依存性の p21/WAF1/Cip1 最少プロモーターをそれぞれルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入した pWWP および pWPdel-BstXI、また、3xSp1 結合配列、変異型 3xSp1 結合配列をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入した Sp1-luc および mtSp1-luc を用いた(Nakano K et al. (1997). J. Biol. Chem., 272, 22199-22206、Sowa Y et al. (1997). Biochem. Biophys. Res. Comm., 241, 142-150)。

これらの遺伝子を上記と同様にトランスフェクションにより強制発現させて、これが TSA の転写誘導に対してドミナントネガティブに働くかどうかを検討した。その結果、DNSp3 により TSA による p21/WAF1/Cip1 の転写誘導は著明に抑制され、これは Sp1 結合配列を含む TSA 依存性の p21/WAF1/Cip1 プロモーターの最少単位(転写開始点より+16~-101)をもつ pWPdel-BstXI でも確認された(図 4a, b)。また同様に、コンセンサスな Sp1 結合配列からの TSA による転写誘導も著明に抑制された(図 4c)。変異 Sp1 結合配列を用いたときには TSA による転写誘導は起こらないが、DNSp3 による影響もみられなかった(図 4d)。いずれのプロモーターを用いた場合にも、TSA 未刺激の基本転写活性に対しては DNSp3 は抑制作用を示さなかった。以上のことから、Sp3 の転写活性化ドメインが TSA 依存性の p21/WAF1/Cip1 の転写誘導に重要であることが明らかになった。Sp3 は TSA 未刺激時には転写因子として極めて弱い活性しかもたないが、TSA 刺激時には恐らく HDAC を抑制することでアセチル化された何らかの分子を認識することにより強力な転写活性を発現するものと予想される。

近年、癌に対する新しいアプローチとして転写調節化学治療あるいは転写調節化学予防が提唱されている(Sakai T. (1996). Jpn. J. Hyg., 50, 1036-1046)。すなわち、細胞増殖抑制性の p53 の標的遺伝子に対して、それらの転写を誘導することにより制癌作用を発揮させようとするものである。しかし、p53 が多くのヒト癌細胞において変異が認められる(Sakai T. (1996). Jpn. J. Hyg., 50, 10

36-1046; Vogelstein B and Kinzler KW. (1992). Cell, 70, 523-526)点で、転写誘導の標的として欠点を有するのに対し、p53 の標的遺伝子の 1 つであり細胞周期抑制作用を持つ p21/WAF1/Cip1 はヒト癌細胞において変異がほとんど報告されていないことから(Chedid M et al. (1994). Oncogene, 9, 3021-3024; Li YJ et al. (1995). Oncogene, 10, 599-601)、その転写誘導によって制癌作用を期待することができる。本発明においてヒストンアセチル化を介して p53 非依存性に p21/WAF1/Cip1 の転写誘導を起こす経路が存在することが見い出されたが、これは p53 が変異している癌に対しても転写調節化学治療あるいは転写調節化学予防が可能であることを示唆している。HDAC 阻害剤は 1 つの可能性として考えられるが、実際に、all-trans-レチノイン酸抵抗性の急性白血病(acute promyelocytic leukemia)では、HDAC 阻害剤でありサラセミア (thalassemia) やアンモニア過剰血症 (hyperammonemic states) の治療に用いられていたフェニル酪酸ナトリウム (sodium phenylbutyrate) が all-trans-レチノイン酸と併用することにより完全治癒させることができると認められている(Warrel RP Jr et al. (1998). J. Natl. Cancer Inst., 90, 1621-1625)。これらの結果は癌治療における 1 つの標的分子として HDAC の可能性を示唆するものである。

産業上の利用の可能性

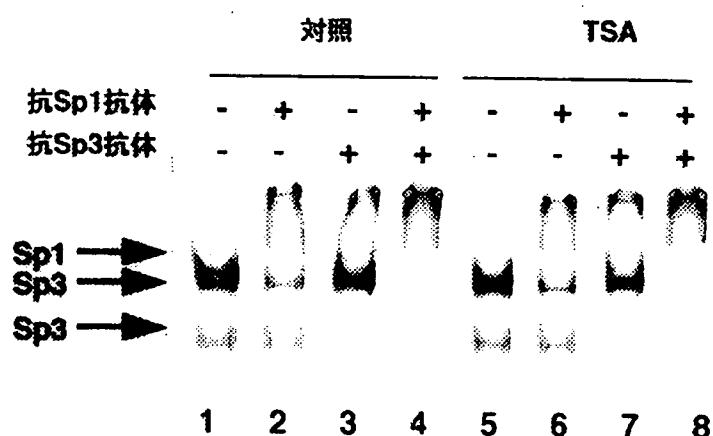
本発明により、HDAC を制御する Sp3 が癌治療における新たな標的分子となり得ることが示された。また、本発明により、Sp3 を標的とした効率的な抗腫瘍剤のスクリーニング方法が提供された。本発明のスクリーニングにより単離される化合物は、癌に対する新しい転写調節化学治療や予防への応用が期待される。

請求の範囲

1. 抗腫瘍剤をスクリーニングする方法であって、
 - (a) (i) Sp3 タンパク質の転写活性化能を有する領域および異種タンパク質の DNA 結合能を有する領域を含む融合タンパク質をコードする DNA を発現可能に含む第一のベクター、並びに (ii) 該異種タンパク質の結合配列を含み、該融合タンパク質が結合した際に活性化する発現制御配列およびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含む第二のベクター、を保持する細胞を提供する工程、
(b) 該細胞に対し、被検試料を接触させ、該レポーター活性を測定する工程、
(c) 被検試料を該細胞に接触させない場合(対照)と比較して、該レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。
2. 異種タンパク質が GAL4 タンパク質、LexA タンパク質、またはテトラサイクリンリブレッサータンパク質である、請求項 1 に記載の方法。
3. レポーター遺伝子がルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ヒト成長ホルモン、または分泌型アルカリホスファターゼをコードする、請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. Sp3 を介する転写活性を促進する化合物を有効成分とする抗腫瘍剤。
5. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のスクリーニングにより単離しうる、請求項 4 に記載の抗腫瘍剤。

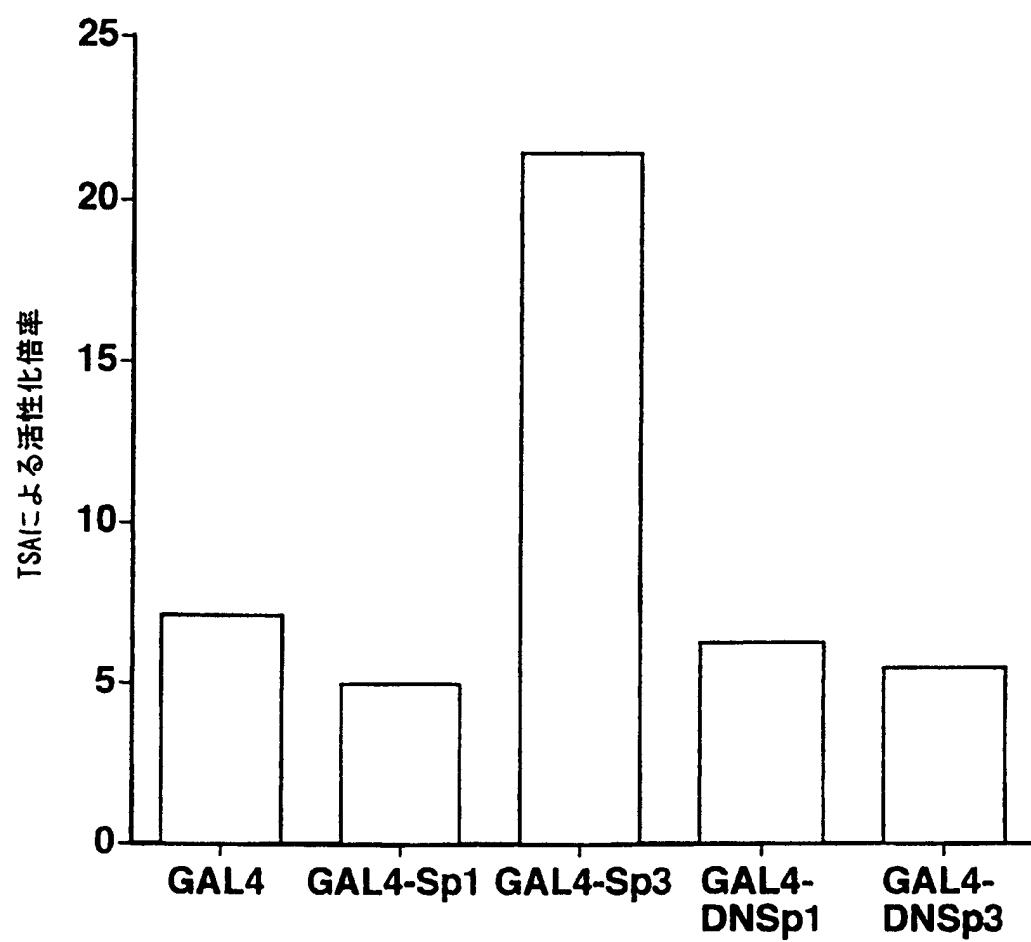
1 / 4

図 1



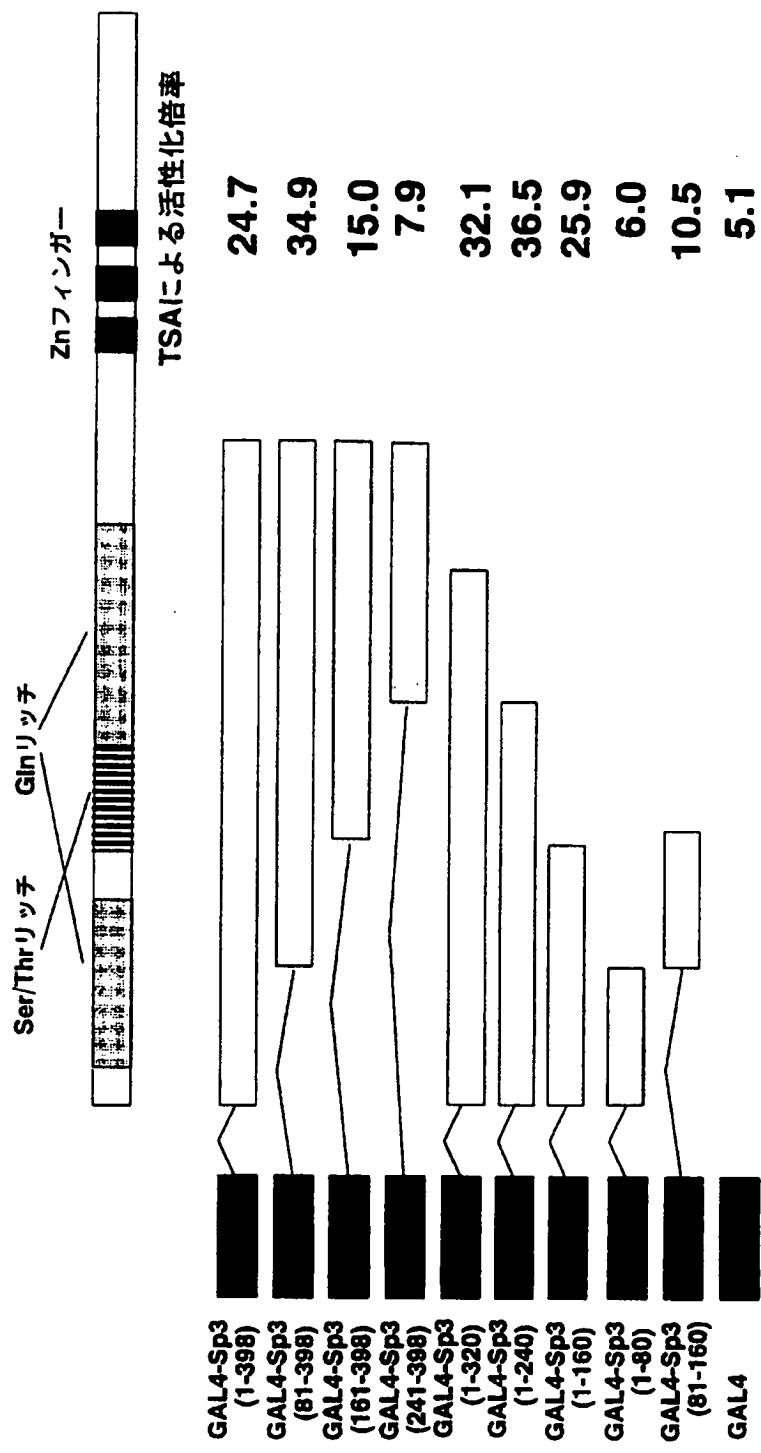
2 / 4

図 2



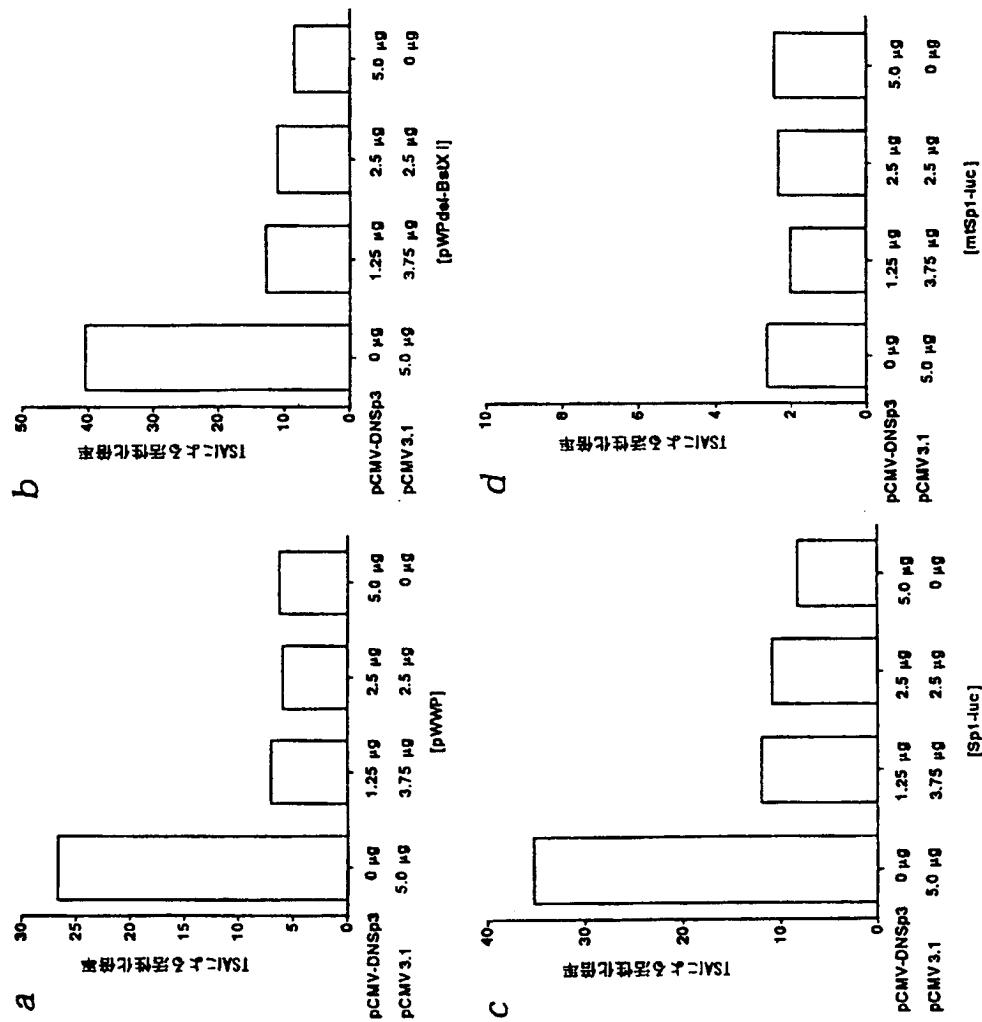
3 / 4

図 3



4 / 4

図 4



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> Methods for screening anti-tumor agents

<130> C2-101PCT

<140>

<141>

)<150> JP 1999-77350

<151> 1999-03-23

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence

<400> 1

cgggtccgc ctcctt

16

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence

<400> 2

agtcgggtc ccgcctcctt

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence

<400> 3

tcgaaaggag gcgggacccg

20

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 4

acaggtgagc ttga

14

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

tcagaaggcca ttgcc

15

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

ccaaaaaaaga agagaaaaggtaacccggcgg 30

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

gaagcatgca cctgc 15

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

cgggatccat tccaaagtgc t gct

23

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

ataggatcct tactccattg tctcatttcc

30

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

cgggatccaa ctctatagat tctgct

26

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

gcggatcccc ctgttaactgt ttgttag

26

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

cgggatccgg ctctaatcaa accttact 28

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

cgggatccgg cattaatgcc gacggaca 28

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

cgggatccca gggaaattat atccagtc

28

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

cgggatccag gaatgatctg aatttgac

28

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

cgggatcctg cagtcatgt ctgagaac

28

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

cgggatccaa gatctgaaga atgaacct

28

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

cgggatccaa aggttccagg attcagct

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q 1/02, C12N 15/09, A61K 31/165, A61P 35/00, A61K 45/00 // C12N 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q 1/02, C12N 15/09, A61K 31/165, A61K 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), REGISTRY (STN), CA (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SOWA, Y. et al. "Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor", Cancer Res. (1999 Sep. 1) Vol. 59, No. 17, p. 4266-4270	1-5
P,X	XIAO, H. et al. "Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21waf1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells", J. Cell. Biochem. (1999 Jun. 1) Vol. 73, No. 3, p. 291-302	1-5
Y	HASEGAWA, T. et al. "Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21 (WAF) promoter", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999 Mar. 5) Vol. 256, No. 1, p. 249-254	1-5
Y	SOWA, Y. et al. "Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997) Vol. 241, No. 1, p. 142-150	1-5
Y	NAKANO, K. et al. "Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 30 May, 2000 (30.05.00)	Date of mailing of the international search report 06 June, 2000 (06.06.00)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Faxsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01778

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line", J. Biol. Chem. (1997) Vol.272, No.35, p.22199-22206	
X	JP, 60-149520, A (AJINOMOTO CO., INC.), 07 August, 1985 (07.08.85) (Family: none)	4-5 1-5
X	NAKAJIMA,H. et al."FR901228,a potent antitumor antibiotics, is a novel histone deacetylase inhibitor", Exp. Cell Res (1998) Vol.241, No.1, p.126-133	4-5 1-5
X	WARRELL, R. P. et al. "Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase", J. Natl. Cancer Inst. (1998) Vol.90, No.21, p.1621-1625	4-5 1-5
P,Y	SOWA, Y. et al. "Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites", Ann. N. Y. Acad. Sci. (1999.) Vol.886, p.195-199	1-5
A	DATTO, M. B. et.al. "Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter", J. Biol. Chem. (1995) Vol.270, No.48, p.28623-28628	1-5
A	ADNANE, J. et al."p21(WAF1/CIP1) is upregulated by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298 through a transforming growth factor β - and Sp1-responsive element:involvement of the small GTPase rhoA", Mol. Cell. Biol. (1998) Vol.18, No.12, p.6962-6970	1-5

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12Q 1/02, C12N 15/09, A61K 31/165, A61P 35/00, A61K 45/00 // C12N 5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12Q 1/02, C12N 15/09, A61K 31/165, A61K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), REGISTRY(STN), CA(STN), JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	SOWA, Y. et al. "Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor", Cancer Res. (1999. Sep. 1) Vol. 59, No. 17, p. 4266-4270	1-5
P, X	XIAO, H. et al. "Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21waf1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells", J. Cell. Biochem. (1999. Jun. 1) Vol. 73, No. 3, p. 291-302	1-5

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 05. 00

国際調査報告の発送日

06.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

高堀 栄二



4 B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	HASEGAWA, T. et al. "Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21(WAF) promoter", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999. Mar. 5) Vol. 256, No. 1, p. 249-254	1-5
Y	SOWA, Y. et al. "Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cipl gene promoter through the Spl sites", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997) Vol. 241, No. 1, p. 142-150	1-5
Y	NAKANO, K. et al. "Butyrate activates the WAF1/Cipl gene promoter through Spl sites in a p53-negative human colon cancer cell line", J. Biol. Chem. (1997) Vol. 272, No. 35, p. 22199-22206	1-5
X Y	JP, 60-149520, A (味の素株式会社) 7.8月. 1985(07.08.85) (ファミリーなし)	4-5 1-5
X Y	NAKAJIMA, H. et al. "FR901228, a potent antitumor antibiotics, is a novel histone deacetylase inhibitor", Exp. Cell Res (1998) Vol. 241, No. 1, p. 126-133	4-5 1-5
X Y	WARRELL, R. P. et al. "Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase", J. Natl. Cancer Inst. (1998) Vol. 90, No. 21, p. 1621-1625	4-5 1-5
P, Y	SOWA, Y. et al. "Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cipl gene promoter through the Spl sites", Ann. N. Y. Acad. Sci. (1999..) Vol. 886, p. 195-199	1-5
A	DATTO, M. B. et al. "Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cipl/p21 promoter", J. Biol. Chem. (1995) Vol. 270, No. 48, p. 28623-28628	1-5
A	ADNANE, J. et al. "p21(WAF1/CIP1) is upregulated by the geranyl geranyltransferase I inhibitor GGTI-298 through a transforming growth factor β - and Spl-responsive element:involvement of the small GTPase rhoA", Mol. Cell. Biol. (1998) Vol. 18, No. 12, p. 6962-6970	1-5

THIS PAGE BLANK (USPTO)